

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Identificación de Salmonella enteritidis y  
Typhimurium aislada de cuyes mediante la técnica de  
reacción en cadena de la polimerasa múltiple**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Geraldine Kimberly Marcelo Monge

**ASESOR**

Abelardo Maturrano Hernández

Lima - Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 205-EAPMV/FMV-2015

PRESIDENTE : .....  
SONIA CALLE ESPINOZA

MIEMBROS : .....  
ABELARDO MATURRANO HERNÁNDEZ  
Asesor de la Tesis

.....  
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN

.....  
SIEVER MORALES CAUTI

San Borja, 26 de noviembre de 2015

V° B°

.....  
MV. Mg. HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO  
Directora de la Escuela Académico Profesional de  
Medicina Veterinaria







## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **jueves 26 de noviembre de 2015**, a las **10:30 horas**, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **205-EAPMV/FMV-2015**, integrado por los siguientes profesores:

<b>SONIA CALLE ESPINOZA</b>	Presidente del Jurado
<b>ABELARDO MATURRANO HERNÁNDEZ</b>	Asesor de la Tesis
<b>ALBERTO MANCHEGO SAYÁN</b>	Miembro del Jurado
<b>SIEVER MORALES CAUTI</b>	Miembro del Jurado

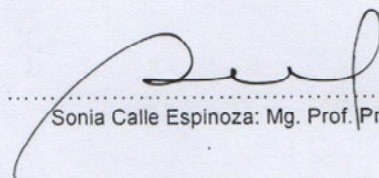
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **MARCELO MONGE, GERALDINE KIMBERLY**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

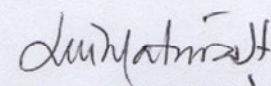
**“IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* ENTERITIDIS Y TYPHIMURIUM AISLADA DE CUYES MEDIANTE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MÚLTIPLE”**

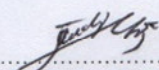
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO ( 18 )**.

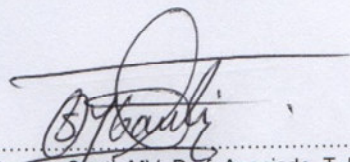
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **11:50 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

  
.....  
Sonia Calle Espinoza: Mg. Prof. Principal; D. E.

  
.....  
Abelardo Maturrano Hernández: Dr. Prof. Asociado, T.C.

  
.....  
Alberto Manchego Sayán: Mg. Prof. Principal, D.E.

  
.....  
Siever Morales Cauti: MV. Prof. Asociado, T. P.



## *Dedicatoria*

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios y a mis padres por siempre haber contribuido con buenos consejos que fueron de gran ayuda en cada decisión tomada en mi vida. A mis hermanas por siempre estar en el lugar y momento indicado.

## *Agradecimientos*

De manera general, deseo expresar mi gratitud a todas las personas y entidades que de una u otra forma han contribuido a la elaboración de esta tesis, con sus consejos y colaboración.

En primer lugar, quiero agradecer al Doctor Abelardo Maturrano, por su extraordinaria labor como asesor de mi tesis, concediéndome todo el material bibliográfico y experiencia en diversos aspectos relacionados al tema.

Le agradezco también al PhD Raúl Rosadio, por la colaboración e interés que además de contribuir con el desarrollo de este trabajo, inspiró en mí el gran deseo por la investigación.

Agradezco en gran medida al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) por ser la entidad financiadora de mi tesis a través del proyecto denominado “Desarrollo de una vacuna para el control y prevención de la salmonelosis en la producción de cuyes” con el contrato N°362-PNICP-PIAP-2014.

El ánimo y la amistad que recibí y sigo recibiendo de mis compañeros de trabajo en la Unidad de Biología y Genética Molecular de la FMV- UNMSM: Raquel Hurtado, Rocío Rímac, Jorge Maximiliano, Ana Chero, Gerardo Díaz, Juan Siuce, Marcos Almeyda, Gustavo Rodríguez, Diandra Martínez, Juan Aguilar y Daniel Fernández han sido especialmente apreciados en la elaboración de esta tesis.

Agradecer también a Yenny Castro y Eduardo López, por brindarnos datos acerca de temas relacionados a la explotación de cuyes y sus principales problemas.

Al Director del Instituto Veterinario de Investigaciones de Trópico y Altura Mantaro (IVITA- Mantaro), Ronald Jiménez por la amplia experiencia compartida en este tema.

Al Sr. Vicente, por colaborar con la búsqueda de textos útiles para el desarrollo del presente trabajo, porque siempre está ahí cuando más lo necesitamos.

A todos, gracias!



La presente Tesis ha sido financiada por:



Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad, a través del proyecto denominado “Desarrollo de una vacuna para el control y prevención de la salmonelosis en la producción de cuyes” con el contrato N°362-PNICP-PIAP-2014.

# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ANEXOS .....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Género Salmonella.....	3
2.1.1. Características generales.....	3
2.1.2. Taxonomía.....	4
2.1.3. Epidemiología.....	5
2.1.3.1. Vía de transmisión.....	6
2.1.3.2. Factores de riesgo de la infección.....	6
2.1.3.3. Factores de virulencia.....	8
2.1.4. Patogénesis.....	8
2.2. Salmonelosis en cuyes.....	11
2.2.1. Manifestaciones clínicas.....	12
2.2.2. Hallazgos a la necropsia.....	13
2.2.2.1. Lesiones anatomopatológicas.....	13
2.2.2.2. Lesiones histopatológicas.....	14
2.3. Diagnóstico.....	14
2.3.1. Identificación y caracterización bioquímica.....	15
2.3.2. Serotipificación.....	16
2.3.2.1. Antígenos somáticos (O).....	16
2.3.2.2. Antígenos flagelares (H).....	17



2.3.2.3. Antígeno capsular (Vi).....	17
2.3.3. Diagnóstico molecular basado en el ADN.....	18
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
2.4.1. Definición.....	18
2.4.2. Etapas de la PCR.....	19
2.4.2.1. Desnaturalización.....	19
2.4.2.2. Hibridación.....	19
2.4.2.3. Extensión.....	20
2.4.3. Componentes de la PCR.....	20
2.4.3.1. ADN patrón.....	20
2.4.3.2. Iniciadores.....	20
2.4.3.3. Concentración de MgCl <sub>2</sub> .....	21
2.4.3.4. <i>Taq</i> polimerasa.....	21
2.4.3.5. dNTP.....	21
2.4.4. Variantes de la PCR.....	21
2.4.5. PCR múltiple.....	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Lugar de estudio.....	24
3.2. Descripción de material experimental.....	25
3.2.1. Cepas estudiadas.....	24
3.2.2. Cepas de referencia.....	25
3.3. Metodología.....	25
3.3.1. Reactivación de cepas.....	25
3.3.2. Extracción de ADN.....	27
3.4. PCR múltiple.....	27
IV. RESULTADOS.....	29

V. DISCUSIÓN.....	31
VI. CONCLUSIONES.....	35
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	36
VIII.ANEXOS.....	46

## RESUMEN

La salmonelosis produce altos índices de mortalidad en cuyes, ocasionada por microorganismos del género *Salmonella*, el cual presenta más de 2500 serovares. Los serovares *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium han sido asociados con las infecciones en cuyes, siendo éste último el mayormente aislado en ellos. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo identificar *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis aislada de cuyes mediante la técnica de PCR múltiple. Con ese fin, se evaluó un total de 25 cepas obtenidas a partir de órganos de cuyes muertos con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas sugerentes de salmonelosis además de pruebas bioquímicas que identifican las cepas como pertenecientes al género *Salmonella* spp. Dichas cepas, posteriormente fueron analizadas por la técnica de PCR múltiple con cebadores específicos para los genes *invA*, *fliC* y *Prot6E* correspondientes al género *Salmonella*, *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis, respectivamente. Las 25 cepas evaluadas fueron identificadas como *Salmonella* Typhimurium, evidenciando bandas de peso molecular correspondientes a los genes *invA* (284 pb) y el gen *fliC* (559 pb). La técnica de PCR es útil para identificar el género *Salmonella* y el serovar Typhimurium a partir aislados de cuyes con signos clínicos sugerentes de salmonelosis.

**Palabras clave:** Cuyes, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, PCR múltiple

## ABSTRACT

Salmonellosis causes high mortality in guinea pigs, it is caused by microorganisms of the genus *Salmonella*, which has more than 2500 serovars. *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium serovars have been associated with infections in guinea pigs, being the latter the most isolated from them. Therefore, this study aimed to identify *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium serovars isolated from guinea pigs by multiplex PCR technique. For this purpose, 25 strains were evaluated from organs of dead guinea pigs with clinical signs and pathological lesions suggestive of salmonellosis, and biochemical tests that identified those strains as *Salmonella* spp. Strains were subsequently analyzed by multiplex PCR with specific primers to identify the *invA*, *fliC* and *prot6E* genes that corresponding to the genus *Salmonella*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis, respectively. The 25 strains tested were identified as *Salmonella* Typhimurium, showing bands corresponding to molecular weight of *invA* genes (284 bp) and *fliC* (559 bp) gene. The PCR technique is useful for identify the genus *Salmonella* and the serovar Typhimurium, isolated from guinea pigs with clinical signs suggestive of salmonellosis.

**Key Words:** Guinea pigs, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, multiplex PCR



## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Salmonella: especies, subespecies, serotipos y su hábitat usual. Sistema de Kauffman– White.....	5
2	Pruebas bioquímicas clave para la identificación de microorganismos pertenecientes al género Salmonella.....	16
3	Cebadores empleados en la PCR múltiple para identificar al género Salmonella, <i>Salmonella</i> Typhimurium y Enteritidis.....	28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Esquema de la invasión de la mucosa por <i>Salmonella</i> .....	10
2	Parálisis de los miembros posteriores en un cobayo con salmonelosis.....	13
3	Colonias de <i>Salmonella</i> spp. en agar sangre.....	26
4	Colonias negras características de <i>Salmonella</i> spp. en agar XLD.....	26
5	Calidad de ADN de las cepas en estudio.....	29
6	La PCR múltiple muestra bandas de 284pb, 185pb y 559pb en el gel agarosa amplificadas para los genes <i>invA</i> , <i>Prot6E</i> , y <i>fliC</i> .....	30

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Protocolo de aislamiento microbiológico de <i>Salmonella</i> spp.....	47
2	Pruebas bioquímicas realizadas previamente a las 25 cepas en estudio y sus resultados.....	48
3	Cebadores específicos para la identificación de genes de salmonela.....	49
4	Cepa de microorganismo integrado en un dispositivo de rehidratación listo para su uso.....	50

## I. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es la principal enfermedad infecciosas en cuyes, presentándose como brotes que afectan a gran parte de la población dentro de una crianza (Morales *et al.*, 2007, Matsuura, 2008) y ocasionando altos índices de mortalidad en todas las etapas productivas trayendo consigo grandes pérdidas en la explotación. La salmonelosis puede ser de curso crónico o agudo, siendo éste último el más letal ya que no se observan signos clínicos aparentes para realizar algún tratamiento (Matsuura *et al.*, 2010).

El agente causal de esta enfermedad, pertenece al género *Salmonella*, siendo *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* las dos especies pertenecientes a dicho género, ésta presenta seis subespecies de las cuales *Salmonella enterica* subsp. *enterica* presenta la mayor cantidad de serovares que afecta una amplia variedad de animales de sangre caliente incluido al hombre (García, 2011; Grimont y Weill, 2007). *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis son los dos serovares notificados con mayor frecuencia a nivel mundial (WHO, 2013).

En distintos estudios realizados en cuyes en el Perú, *Salmonella* Typhimurium ha sido el serovar mayormente detectado, diagnosticado principalmente mediante pruebas bioquímicas y serológicas (Matsuura *et al.*, 2010; Guamán, 2014). Las técnicas de diagnóstico microbiológico han sido de gran utilidad como primer paso en el aislamiento e identificación de microorganismos, pese a ello en la actualidad, los países desarrollados optan por técnicas de



diagnóstico molecular, debido a su rapidez y eficacia. Una de las pruebas moleculares que ha sido de gran uso en los últimos años es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como las diferentes variantes de ésta.

La PCR múltiple, una variante de la PCR convencional, es empleada para la detección y amplificación simultánea de distintas secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) en una misma reacción. Actualmente, existen protocolos de PCR para la detección e identificación de *Salmonella* spp. en muestras provenientes de la industria avícola por su importancia en la salud pública (Soumet *et al.*, 1999; Jamshidi *et al.*, 2010). Así mismo, la identificación completa de los serovares generalmente se realiza por medio de pruebas serológicas, aunque ya existen cebadores específicos para la detección de genes blanco presentes en los *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium (Jamshidi *et al.*, 2010; Soumet *et al.*, 1999)

Por ello, el objetivo del presente estudio fue identificar *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium aislada de cuyes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa múltiple.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. GÉNERO *Salmonella*

El género *Salmonella* recibe su nombre en honor al patólogo veterinario americano Daniel Elmer Salmon (1850-1914) en 1900, quien en 1876 fue reconocido como el primer doctor en medicina veterinaria graduado en una universidad de Estados Unidos. Salmon en colaboración con Theobald Smith (1859-1934), descubrieron los gérmenes designados como salmonelas, en 1885, aislándolos de cerdos con cólera (Stanchi, 2007).

#### 2.1.1. Características generales

Los miembros de este género son bacilos gramnegativos, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*), anaerobios facultativos, no encapsulados y no esporulados. La diferenciación entre las especies y subespecies se realiza tomando en cuenta diferentes propiedades bioquímicas, tales como que no fermentan lactosa (excepto *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae* y *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*) ni sacarosa, fermentan glucosa y producen gas (excepto *S. Typhi*), no producen indol, no degradan la urea, descarboxilan la lisina y ornitina y presentan muchas más características bioquímicas que permiten la clasificación en especies y subespecies. Estos microorganismos se desarrollan

generalmente a temperaturas entre 8 y 45°C, un pH de 4 a 8 (Koneman *et al.*, 1998; Walker, 1999).

### 2.1.2. Taxonomía

El género *Salmonella* pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales* y Clase  $\gamma$  Proteobacteria (Garrity *et al.*, 2004). La clasificación más aceptada es la que propone que el género *Salmonella* está dividida en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, datos muy similares a los obtenidos en estudios de ADN mediante técnicas de hibridación (Caffer y Terragno, 2001). Las dos especies, se subdividen de la siguiente manera:

- *Salmonella enterica*, agrupa a la mayoría de las bacterias del género que se aíslan de animales de sangre caliente, incluido en hombre, y se divide en seis subespecies, según el sistema de Kauffman– White.
  - a. Subespecie I. *S. enterica* subsp. *enterica*
  - b. Subespecie II. *S. enterica* subsp. *salamae*
  - c. Subespecie III a. *S. enterica* subsp. *arizonae*
  - d. Subespecie III b: *S. enterica* subsp. *diarizonae*
  - e. Subespecie IV. *S. enterica* subsp. *houtenae*
  - f. Subespecie VI. *S. enterica* subsp. *indica*
- *Salmonella bongori*. Subespecie V: No constituye un patógeno para los humanos pero si ha sido implicada en ciertas patologías en animales (Grimont y Weill, 2007; Stanchi, 2007; Farmer, 2003; Terragno *et al.*, 2003).

Existen más de 2500 serotipos identificados según el sistema de Kauffman- White, en el cuadro 1 se muestra el número de serotipos identificadas hasta el momento dentro de cada especie y subespecie, así como sus principales hábitats.

Cuadro 1. Salmonella: especies, subespecies, serotipos y su hábitat usual. Sistema de Kauffman– White (Grimont y Weill, 2007).

<b>Especie y subespecie de Salmonella</b>	<b>Número de serotipos dentro de la especie</b>	<b>Hábitat usual</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre fría/caliente y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (VI)	73	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (IV)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
<b>Total</b>	<b>2579</b>	

### 2.1.3. Epidemiología

Salmonella está ampliamente distribuida en la naturaleza, y se encuentra como comensal y patógeno en el tracto gastrointestinal de humanos, mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves, insectos y roedores, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y los animales (Radostits *et al.*, 2002). Algunos serotipos tienen poca especificidad de hospedador y



pueden aislarse inclusive en el tracto intestinal de animales de sangre fría (Velasco y Yamasaki, 2002).

Los serotipos de *Salmonella* varían en su distribución, sin embargo, los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* se encuentran distribuidos mundialmente. Siendo este último el de mayor aislamiento tanto en humanos como en animales en varias partes del mundo (CFSPH, 2005).

La naturaleza de la infección por *Salmonella* spp. está determinada por una serie de factores entre los que se encuentran la vía de transmisión, la dosis infectante, el serotipo implicado, la presencia y grado de inmunidad y el grado de resistencia del hospedador (García, 2011).

#### **2.1.3.1. Vía de Transmisión**

*Salmonella* se propaga por contacto directo e indirecto. Los animales infectados, fuentes de las bacterias, excretan el microorganismo en cantidades considerables en heces y orina, contaminando así el ambiente que los rodea, principalmente el alimento. Los animales susceptibles se infectan por vía oral al consumir agua o alimento contaminado con material fecal, también se ha observado que la vía aerógena, conjuntival y heridas abiertas constituyen puertas de ingreso para la bacteria (Radostits *et al.*, 2002).

Las malas prácticas de manejo sugieren un deficiente nivel de bioseguridad que ocasiona presencia de roedores y aves contaminados, ingreso no controlado de personal, estrés en los cuyes (Figuroa y Verdugo, 2005). Además se ha determinado que las variaciones de temperatura y humedad predisponen a la aparición de infecciones (Ramírez, 1972).

#### **2.1.3.2. Factores de riesgo de la infección**

Una de las formas más comunes de introducir la infección en una explotación es por medio del alimento debido a que puede existir una contaminación casi siempre durante o tras el proceso de obtención y preparación. Deben considerarse principalmente contaminados determinados piensos o componentes de ellos, como la hierba fresca y el heno, principalmente

aquellas que han sido provenientes de zonas donde riegan con aguas residuales no tratadas. Asimismo, los concentrados proteicos de origen animal o vegetal son sospechosos (Stellmacher, 1981). Aunque la exposición a *Salmonella* es frecuente, se requiere de un inóculo de aproximadamente  $10^6$ - $10^8$  bacterias para el desarrollo de la enfermedad sintomática (Sánchez y Cardona, 2003).

La introducción de animales portadores a una explotación constituye una importante fuente de infección para aquellas que son libres de salmonelosis (Radostits *et al.*, 2002). Para que la salmonelosis curse como enfermedad, es necesaria la intervención de algún factor externo que desencadene “estrés” en el animal, como el transporte o movimiento de animales dentro del criadero o hacia el exterior, el mismo que se acentúa cuando se realiza con un inadecuado manejo (Ramírez, 1972; Radostits *et al.*, 2002). Esta enfermedad también se puede producir debido a la falta de alimento y agua, el cambio brusco de la dieta (modifican componentes del tubo gastrointestinal), hacinamiento, enfermedades intercurrentes que sugieren un aumento en la susceptibilidad de la salmonelosis, la edad del animal (animales más jóvenes son más susceptibles) (Radostits *et al.*, 2002).

Por otro lado, el fácil ingreso de animales ajenos a la explotación como ratas y ratones cumple un papel importante como transmisores de salmonelosis, debido que no muestran signos clínicos de enfermedad, contaminando el ambiente y alimento. Se ha encontrado una alta prevalencia de *Salmonella* Enteritidis en ratones presentes en galpones de aves (Garber *et al.*, 2003; Meerburg y Kijlstra, 2007). Existen además otras formas menos frecuentes de contaminación como insectos, aves silvestres y larvas de nematodos previamente infectados por *Salmonella* (Radostits *et al.*, 2002). Sin embargo, Ordaya (2008), en un estudio realizado en una granja de crianza comercial de cuyes en el Valle de Mantaro, encontró que las moscas son un riesgo en la transmisión de *Salmonella enterica* en una proporción de 75%, seguidas por las ratas y gorriones (12.5%), y fómites (12.5%).

Estos microorganismos pueden sobrevivir largos periodos de tiempo de casi 14 meses, desarrollándose adecuadamente en un rango de temperatura de entre 8 y 45°C y en intervalos de pH de 4-8. Sin embargo, esta bacteria es sensible al calor y no sobrevive a temperaturas superiores de 70°C (Radostits *et al.*, 2002).

La salmonelosis afecta de forma universal a todas las especies generando de esta manera problemas en explotaciones pecuarias y en salud pública, en los cobayos esta enfermedad origina altos porcentajes de morbilidad y mortalidad que sumado al escaso conocimiento en diagnóstico y tratamiento hacen del productor de cobayos blanco fácil de esta enfermedad. (Ramírez, 1976; Radostits, 2002).

### **2.1.3.3. Factores de virulencia**

Todos los serotipos de *Salmonella* spp. conocidos son patogénicos para el hombre y los animales (Parker y Collier, 1990). En varios estudios se ha demostrado que *Salmonella* preferencialmente se une e invade las células en la placa de Peyer del intestino delgado en ratones infectados oralmente, sin embargo las bacterias pueden también ser encontradas en enterocitos no fagocíticos. Las interacciones entre especies de *Salmonella* y células hospederas son íntimas y complejas (Darwin y Miller, 1999).

*Salmonella* presenta genes de virulencia, localizados en el cromosoma o en plásmidos, que codifican factores solubles que modifican la fisiología celular del hospedero o que protegen a la bacteria de sistemas antimicrobianos del mismo (García *et al.*, 1992). Las islas de patogenicidad son grupos de genes de virulencia. Estas islas se ubican frecuentemente adyacentes a genes de ARN de transferencia (ARNt) de la bacteria, lo que sugiere que éstos genes fueron adquiridos durante la evolución bacteriana (Marcus *et al.*, 2000; Goyache y Briones, 2002).

### **2.1.4. Patogénesis**

La patogenia de la salmonelosis puede dividirse en dos fases: una primera fase de localización intestinal y, en algunos casos una segunda fase sistémica. Si la entrada se ha

producido por vía oral, *Salmonella* debe hacer frente a una serie de condiciones adversas como son el pH ácido del estómago, las sales biliares, la microflora intestinal o el peristaltismo. Una vez superadas estas barreras, las salmonelas colonizan el tracto gastrointestinal adhiriéndose a las células epiteliales de la mucosa a través de las fimbrias (Dibb-Fuller *et al.*, 1999; Vimal *et al.*, 2000).

Seguidamente, se produce la invasión celular regulada por los genes de la isla de patogenicidad SPI-1. *Salmonella* es capaz de introducir en la célula hospedadora una serie de proteínas, a través del sistema de secreción tipo III, las cuales van a reorganizar el citoesqueleto dando lugar a una endocitosis (Zhou y Galán, 2001). Como consecuencia de esta interacción, se concentra en la zona un elevado número de polimorfonucleares y se induce la producción de citoquinas proinflamatorias que van a provocar cambios que pueden afectar a la modulación de la secreción del cloro, contribuyendo directamente a la aparición de la diarrea (Eckmann *et al.*, 1997). La reacción inflamatoria trae como consecuencia un aumento de la permeabilidad vascular que provoca un edema de la mucosa así como una transmigración de células inflamatorias a la luz intestinal. Además, la respuesta inflamatoria, junto con la producción de toxinas, provoca daños en la superficie del epitelio intestinal, que pueden ir desde ulceración hasta destrucción de la mucosa (Ekperigin y Nagaraja, 1998), facilitando la salida de fluidos extravasculares y, consecuentemente el cuadro clínico de diarrea (Zhang *et al.*, 2003).

La fase sistémica se inicia cuando *Salmonella* alcanza la lámina propia y es fagocitada por los macrófagos. La clave para el mantenimiento de esta infección se basa en la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos. Este mecanismo está regulado por la isla de patogenicidad SPI-2, que permite la translocación de proteínas bacterianas a través de la membrana vacuolar al citoplasma de los macrófagos (Hensel, 2000). En el interior de los macrófagos, *Salmonella* logra alcanzar los ganglios linfáticos mesentéricos. En algunas ocasiones, cuando la infección la producen los serotipos más invasivos o cuando afecta a animales debilitados, *Salmonella* puede llegar a la circulación sanguínea y alcanzar así

diferentes órganos internos, principalmente el hígado y el bazo, donde se localizan en elevadas concentraciones es en las primeras fases de la infección (Barrow, 1999).

En concordancia con estos mecanismos, numerosos estudios basados en infecciones experimentales, principalmente con los serotipos Cholerasuis y Typhimurium, han descrito la presencia de *Salmonella*, además de en el tracto gastrointestinal (intestino y ganglios linfáticos mesentéricos) en diversos órganos como el bazo, el riñón, el pulmón, el corazón, el hígado, las tonsilas y diferentes ganglios linfáticos (mesentéricos, pulmonares, inguinales, cervicales, etc.) (Wood *et al.*, 1989; Wood y Rose, 1992; Fedorka-Cray *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1995; Cote *et al.*, 2004; Loynachan *et al.*, 2004; Collazos, 2008).

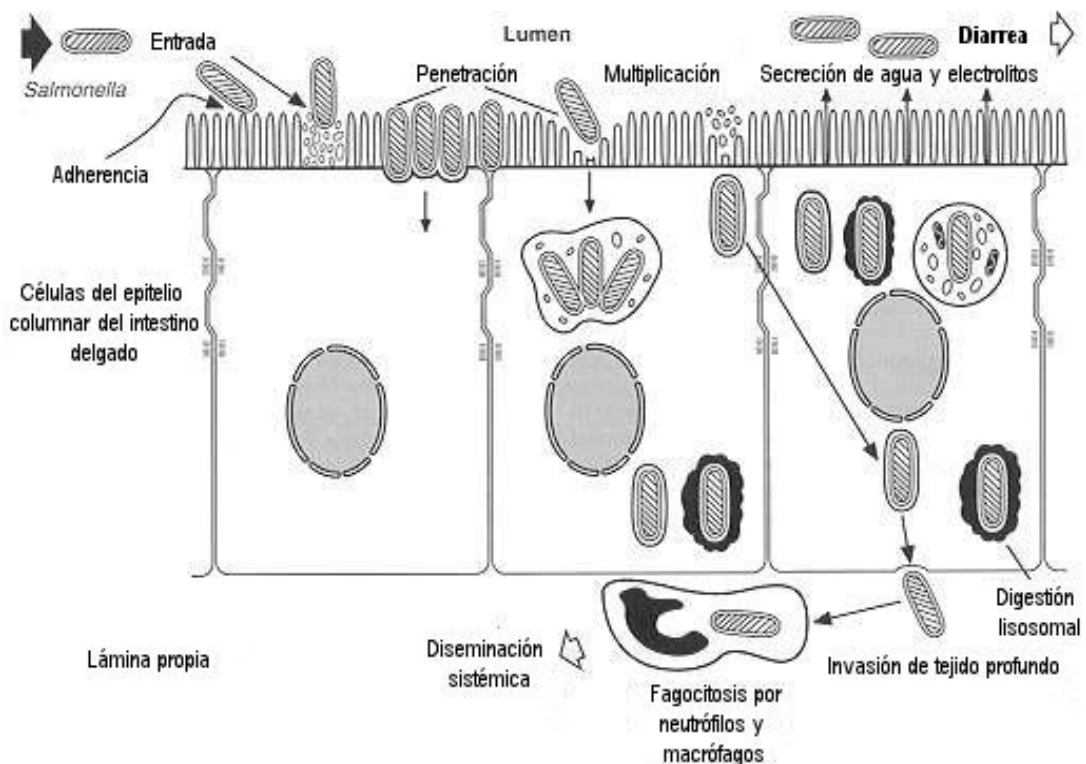


Figura 1. Esquema de la invasión de la mucosa por *Salmonella* (Ralph, 1996).

## 2.2.SALMONELOSIS EN CUYES

El cuy (*Cavia porcellus*) también denominado cobayo, curi y conejillo de indias es un mamífero doméstico nativo de los andes sudamericanos (Bustamante, 1993; Chauca, 1997). En el Perú, esta especie constituye un producto alimenticio de alto valor nutricional que contribuye a la alimentación de la población rural, aunque en las últimas décadas se ha convertido en una carne muy requerida en el mercado nacional e internacional. Por otro lado, esta especie ha sido criada durante muchos años como animal de compañía y de laboratorio en Europa y América del Norte (Bustamante, 1993; Enríquez y Rojas, 2004; Wagner y Manning, 1976).

La mayor población de cuyes se encuentra en el Perú, que según el último censo agropecuario realizado por el INEI (2012) asciende a más de 12 millones, siendo Cajamarca, Cusco, Ancash y Apurímac los departamentos en donde se concentra la mayor población de estos animales. La crianza familiar es muy difundida en nuestro país llegando a un 93.1%, mientras que la familiar- comercial constituye un 6,8% y la del tipo comercial solo representaba el 0.1% de los tipos de crianzas hasta el año 1994 (principalmente alrededor de áreas urbanas) (Chauca, 1994).

La enfermedad más importante que afecta al cuy es la salmonelosis, durante largo tiempo se ha observado una gran susceptibilidad en ellos, sin embargo aún son escasos los reportes con datos exactos que permitan tener una idea clara de la realidad de la salmonelosis en cuyes (Matsuura *et al.*, 2010). Es una enfermedad con un impacto económico negativo en la producción de cuyes por los altos índices de mortalidad y por el conjunto de patologías orgánicas y sistémicas que producen (Cano, 2012).

Los serovares *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* han sido aislados de cuyes, estando en estos animales de manera latente o introducidos por los alimentos o camas contaminadas con excretas de roedores (Peters, 1981). Los serovares más comunes en cuyes domésticos son *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium (Richardson, 2000).

En nuestro país el serovar que se ha aislado con mayor frecuencia de órganos de cuyes muertos debido a esta enfermedad, es el serovar *Salmonella* Typhimurium, en frecuencias que superan el 95% en relación a otros serovares. Uno de los primeros reportes en nuestro país es el descrito por Ameghino (1968), acerca de un brote de salmonelosis con alrededor de 95 % de mortalidad, en una granja en Huancayo, logra aislar Salmonellas en forma casi pura a partir de pulmones, hígado e intestinos que posteriormente se identificaron como *S. Typhimurium*. Posteriormente, Ramírez (1972), realizó un estudio bacteriológico de un brote infeccioso en cobayos en una granja de la localidad de Barranca, encontrando a microorganismos del género *Salmonella* (*S. Typhimurium* y otros serovares) en un 65.5% de los animales estudiados. En un estudio realizado en la provincia de Carhuáz, Áncash se halló una prevalencia de 61.5% de *Salmonella enterica* (Matsuura, 2010), mientras que Morales (2012), aisló *Salmonella* Typhimurium un 16.7% del total de cepas obtenidas por hisopados rectales de cuyes reproductores machos mejorados destinados a ser introducidos al distrito de San Marcos (crianza familiar- comercial). Guamán (2014) reporta un 34% de presencia de este agente en el sistema de crianza comercial.

En cuyes con fines de investigación como animales de laboratorio se ha logrado identificar distintos serovares tales como *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Florida*, *S. Bredeney*, *S. Pomona*, *S. Dublin*, *S. Ochiogu*, *S. Limite* (Garmendia *et al.*, 2000). Así también otros estudios reportan a *S. Enteritidis*, *Typhimurium* y *S. Dublin* en cuyes (Parra *et al.*, 2002).

### **2.2.1. Manifestaciones clínicas**

La salmonelosis en cuyes se puede manifestarse de dos formas: crónica o aguda, siendo esta última la que mayor mortalidad causa (Evans, 2005).

La forma aguda se presenta como un cuadro septicémico agudo sucediéndose las muertes en un lapso de 24 a 48 horas, en muchos de los casos los animales mueren sin mostrar signo clínico alguno, sin embargo en algunas ocasiones se observa decaimiento, postración, anorexia, adelgazamiento, pelos ásperos y erizados, opistótonos, y parálisis de los miembros posteriores

(figura 2), en ciertas ocasiones también se observa diarrea acompañada de mucus, y en gestantes se produce el aborto (Ramírez, 1976; Bustamante, 1993; Evans, 2005).

Los cuadros crónicos son los casos más comunes y su presentación indica que Salmonella se encuentra establecida en la granja. El tipo de presentación dependerá del serotipo y cepa de la Salmonella; sin embargo, el cuy también presenta un estado de infección latente en el cual no presenta manifestaciones clínicas de ello hasta que sea sometido a situaciones de estrés (Ganaway, 1976; Bunte; 1996).



**Figura 2. Parálisis de los miembros posteriores en un cobayo con salmonelosis (Layme, 2009)**

## **2.2.2. Hallazgos a la necropsia**

### **2.2.2.1. Lesiones anatomopatológicas**

Las lesiones agudas de la salmonelosis en cobayos implican al hígado, bazo, tejidos linfoides y el intestino (aumento de tamaño, congestión y necrosis focal). Asimismo, en el tracto gastrointestinal en muchas ocasiones se halla un aumento de gas y líquido, así como una disminución del grosor de la pared intestinal. En los casos subagudos a crónicos se suelen hallar focos de necrosis en el hígado y en otros órganos se observa hepatomegalia, esplenomegalia y



pulmones congestionados. En el aparato reproductor de la hembra puede haber focos necróticos en el miometrio y abortos. Existen además otras lesiones encontradas con frecuencia, como la presencia de pseudomembranas en la superficie hepática, ofreciendo el cuadro de peri hepatitis, vesícula biliar aumentada de tamaño debido a la mayor cantidad de líquido biliar (Havelaar *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2002; Figueroa y Verdugo, 2005).

#### **2.2.2.2.Lesiones histopatológicas**

Las lesiones a nivel histológico provocado por la salmonelosis se evidencian por una invasión bacteriana con necrosis, presencia de histiocitos y formación de abscesos. Las áreas de necrosis se encuentran rodeadas por histiocitos. Además, las placas linfoides del yeyuno e íleon presentan acumulaciones focales de polimorfonucleares e histiocitos. En casos crónicos los nódulos incrementan de tamaño y forman abscesos. En el hígado se observa una hepatitis granulomatosa multifocal, en el bazo una esplenitis y linfadenitis con áreas de necrosis rodeadas por célula mononucleares y neutrófilos (Ganaway, 1976).

### **2.3.DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la salmonelosis en cobayos debe ser realizado asociando las manifestaciones clínicas, hallazgos en la necropsia y el aislamiento bacteriano. Los órganos de elección para recuperar la bacteria en animales enfermos son principalmente el hígado y bazo, pero también se pueden aislar de otros órganos como pulmón, ganglio mesentérico, intestino, útero, vesícula biliar y glándula mamaria (Ameghino, 1968; Ramírez, 1972; Bustamante, 1993; Matsuura, 2008).

Existen diversos métodos para el diagnósticos de *Salmonella* spp., siendo el cultivo microbiológico la prueba más comúnmente empleada para el aislamiento de la bacteria a partir de tejidos y heces (Pachón, 2009). El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y ser al mismo tiempo simple, rápido y económico. Sin embargo, ningún método

cumple con todos los criterios y ninguno es óptimo para todas las condiciones. Por ello es recomendable consultar la literatura antes de elegir un método para un determinado propósito y es recomendable la comparación frecuente de los métodos de cada laboratorio con los nuevos métodos que surjan. Los criterios para la identificación bioquímica de *Salmonella* spp. están ampliamente descritos, sin embargo estas pruebas dependen de la expresión fenotípica de las características analizadas y pueden verse afectadas por variaciones en los medios de cultivo y en las condiciones de incubación. Como una alternativa se están introduciendo cada vez más los métodos moleculares; que permiten un diagnóstico más rápido y pueden ser más simples de realizar, pero tienen la desventaja que son caros (Caffer *et al.*, 2008).

### **2.3.1. Identificación y caracterización bioquímica**

Los métodos para el aislamiento de la bacteria están divididos en tres etapas sucesivas las cuales son: enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, siembra en placa con medios sólidos selectivos y diferenciales. Posteriormente se lleva a cabo el estudio de las características bioquímicas de las colonias sospechosas en los medios adecuados para su identificación y finalmente el análisis antigénico (Caffer *et al.*, 2008).

La diferenciación bioquímica permite confirmar la identidad de *Salmonella* frente a otras enterobacterias que hayan podido ser aisladas, conjuntamente, en los medios selectivos (García, 2011). Según las características de crecimiento de las colonias presuntivas de *Salmonella*, se realiza la identificación o confirmación bioquímica, en esta etapa las bacterias son diferenciadas por su actividad metabólica tomándose simultáneamente dos pruebas diferenciales como son el agar triple azúcar hierro (TSI), lisina hierro (LIA), que a su vez pueden ser ayudados con pruebas bioquímicas complementaria como agar urea, agar citrato de Simons, producción de indol, evaluación de la movilidad, producción de sulfuro de hidrogeno, y muchas más (MacFaddin, 2000). En el cuadro 2 se observan las reacciones producidas en la batería de bioquímicas utilizada normalmente para la identificación de enterobacterias pertenecientes al género *Salmonella* (Koneman y Allen, 1999; MacFaddin, 2000).

**Cuadro 2. Pruebas bioquímicas clave para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* (MacFaddin, 2000).**

<b>PRUEBA BIOQUÍMICA</b>	<b>RESULTADO PARA <i>Salmonella</i> spp.</b>
TSI	K/A H <sub>2</sub> S <sup>++</sup>
LIA	K/K H <sub>2</sub> S <sup>++</sup>
UREA	-
MOTILIDAD	+
INDOL	-
CITRATO	+

K: alcalinidad; A: acidez; H<sub>2</sub>S: sulfuro de hidrogeno

### **2.3.2. Serotipificación**

Las especies de *Salmonella* se detectan inicialmente por sus características bioquímicas, sin embargo los grupos y las especies se identifican mediante análisis antigénicos. Al igual que otras enterobacterias, *Salmonella* posee dos clases de antígenos principales los cuales son los antígenos O (somáticos) y antígenos H (flagelares) (Brooks *et al.*, 1999; Koneman *et al.*, 1997).

La clasificación de serotipos o serovares se realiza en función de la combinación de antígenos O, de antígenos H y, eventualmente, del antígeno capsular (Vi) (Popoff y Le Minor, 1997). Estos antígenos se identifican mediante técnicas de microaglutinación empleando sueros específicos, generalmente comerciales, frente a cada uno de ellos. De esta forma se caracteriza a la cepa en función de su estructura antigénica.

#### **2.3.2.1. Antígenos Somáticos (O)**

Están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos; su composición es aproximadamente: 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina. Son cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de envoltura (LPS) que se encuentra en todos los microorganismos Gram negativos.

La cadena de polisacáridos del antígeno O es un polímero de unidades repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Como esta estructura difiere ampliamente entre las distintas serovariedades, hay diferencias en la especificidad antigénica O.

Estos antígenos son termoestables y resistentes a ácidos diluidos y alcohol. La estructura somática se denomina con la letra O seguida de números arábigos separados por comas, que corresponden a sus factores, por ej. *S. Typhimurium* O: 1, 4, 5, 12; *S. Enteritidis* O: 1, 9, 12 (Caffer y Terragno, 2001).

### **2.3.2.2. Antígenos flagelares (H)**

El flagelo es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión y un filamento. El cuerpo basal ancla el flagelo a la envoltura de la célula y el segmento de unión une el cuerpo basal con el filamento. En la serotipificación flagelar de *Salmonella* se usa solamente la especificidad antigénica del filamento. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de flagelina.

Unas pocas serovariedades de *Salmonella* poseen una sola fase flagelar, esas cepas se llaman monofásicas, por ej. *Salmonella* Enteritidis (9,12:g,m:-), *Salmonella* Typhi (9,12 [VI]:d:-); pero la gran mayoría de las serovariedades tienen dos especificidades en su antígeno flagelar, es decir son cepas difásicas; por ej., *Salmonella* Typhimurium (1,4,5,12:i:1,2) y *Salmonella* Hadar (6,8:z10:e,n,x), que expresan la fase 1 (identificada en los ejemplos por las fases: i ó z10) y la fase 2 (por las fases: 1,2 y e, n, x respectivamente) (Caffer y Terragno, 2001).

### **2.3.2.3. Antígeno capsular (Vi)**

Este antígeno se encuentra en sólo tres serovariedades: *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y en algunas cepas de *S. Dublin* (Caffer y Terragno, 2001).

### **2.3.3. Diagnóstico molecular basado en el ADN**

Los métodos moleculares basados en el ADN no son afectados por las variaciones ambientales a diferencia de lo que suele suceder con los métodos de tipificación fenotípica, ya que el genoma de un organismo es estable en diferentes ambientes. El diagnóstico molecular se considera un diagnóstico directo, y actualmente es el sistema de diagnóstico con mayor especificidad, sensibilidad y rapidez (Velilla, 2006).

## **2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

### **2.4.1. Definición**

La técnica de PCR es un método enzimático de síntesis *in vitro* de largas cantidades de una región diana de ADN (Brown, 2000). Este proceso de amplificación requiere de cantidades mínimas de ADN. La técnica de PCR fue desarrollada por K. Mullis en 1985, es un método *in vitro* que permite amplificar secuencias específicas de ADN (Mullis y Fabela, 1987). Es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia en el diagnóstico de enfermedades, sobre todo de aquellas provocadas por patógenos difíciles de cultivar (Gonzales y Rojas, 2005).

La PCR es hoy en día una herramienta imprescindible en los laboratorios de diagnóstico clínico a nivel mundial (Herráez, 2012). La PCR ha revolucionado el diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas, el cual a diferencia de los métodos tradicionales que requieren 6 o 7 días para dar un resultado definitivo, permite obtener los resultados en tan solo 1 a 3 días, dependiendo de diversas modificaciones en el protocolo de trabajo, permite la detección e identificación rápida y precisa de *Salmonella* (Myint *et al.*, 2006).

La PCR ofrece múltiples ventajas, tales como la rapidez con la que se pueden obtener resultados y no solo de una muestra sino de varias, la sensibilidad de la prueba ya que detecta fracciones de ADN de todo tipo de microorganismo, la especificidad debido a que identifica el ADN constituye el material genético único de cada organismo así como también su versatilidad,

información genética accesibilidad de la muestra, no requiere esterilidad microbiológica, detección de organismos viables y no viables (Innis,1995). Pero se debe tener en cuenta también sus desventajas, ya que uno de los principales problemas es el riesgo a la contaminación cruzada debido a que una pequeña molécula de extraña podría contaminar las muestras en una amplificación subsecuente (Innis, 1995; Sambrook *et al.*, 1989).

## **2.4.2. Etapas de la PCR**

Las etapas de PCR se llevan a cabo, una tras otra, en episodios cíclicos. Cada ciclo comprende tres etapas.

### **2.4.2.1.Desnaturalización**

Consiste en la desnaturalización del ADN por calentamiento a 95°C, durante la desnaturalización las dobles cadenas del ADN se separan para formar cadenas sencillas, durante la etapa inicial de desnaturalización es importante que el patrón de ADN se desnaturalice por completo. Una desnaturalización incompleta del ADN resultará en el uso ineficiente del patrón en el primer ciclo de amplificación y en consecuencia, en escaso rendimiento del producto de PCR (Sambrook *et al.*, 1989; Brown, 2000).

### **2.4.2.2.Hibridación**

Durante la hibridación (a temperatura que oscilan entre 45°C y 60°C), un iniciador se une a una cadena de ADN y otro se une a la cadena complementaria. Los sitios de hibridación de los iniciadores se han elegido para que fomenten la síntesis del ADN en la región de interés durante la extensión. La temperatura de hibridación se calcula 5°C por debajo de la temperatura de fusión del duplo iniciador- patrón de ADN. Si se obtienen productos de la PCR no específicos, además del producto esperado, la temperatura de hibridación se puede optimizar aumentando por incrementos de 1 a 2°C (Sambrook *et al.*, 1989; Brown, 2000).

### **2.4.2.3.Extensión**

Una ADN polimerasa termoestable es adicionada, llamada *Taq* polimerasa (ADN polimerasa tipo I, enzima de una bacteria termotolerante, *Thermus aquaticus*), junto con un suministro e precursores de ADN (deoxinucleosidos trifosfatos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la mezcla es calentado a una temperatura óptima para la síntesis de ADN, que generalmente esta entre 70 y 75 °C (Brown, 2000; Stracham y Read, 1999). Los oligonucleótidos alineados en el ADN molde, actúan ahora como cebadores para la síntesis de nuevos polinucleótidos complementarios para las cadenas molde de ADN (Brown, 2000).

Los ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión son repetidos de 20 a 30 veces con un número de moléculas de ADN sintetizado que se dobla en cada ciclo, esta exponencial amplificación resulta en la síntesis de un gran número de copias de la secuencia de ADN por el par de iniciadores (Sambrook *et al.*, 1989; Brown, 2000).

## **2.4.3. Componentes de la PCR**

### **2.4.3.1.ADN patrón**

Casi todos los métodos estándar de extracción de ADN son apropiados. La cantidad adecuada esta entre 0.1 y 1µg de ADN genómico, para una mezcla total de reacción de 100ul. Cantidades más grandes de ADN patrón elevan, generalmente el rendimiento de productos de la PCR no específicos (Sambrook *et al.*, 1989; Brown, 2000).

### **2.4.3.2.Iniciadores**

Los cebadores son los componentes clave de la PCR y el acierto o falla de la amplificación depende mucho de su correcta designación (Brown, 2000). Los iniciadores de la PCR deben tener entre 10 y 24 nucleótidos de longitud. El contenido de GC debe estar entre 40 y 60%, además el iniciador no debe ser complementario o autocomplementario de otro cebador en la mezcla de reacción, debido a que no se desean tener dímeros de cebadores u horquillas (Sambrook *et al.*, 1989; Brown, 2000).

### **2.4.3.3. Concentración de MgCl<sub>2</sub>**

Debido a que los iones Mg<sup>2+</sup> forman complejos con los dNTP, con los iniciadores y los patrones de ADN, hay que establecer la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para cada experimento. Si los iones Mg<sup>++</sup> son demasiado escasos, se obtiene un bajo rendimiento del producto de la PCR y si son abundantes, de concentración de MgCl<sub>2</sub> es de 1 a 3 mM, en las condiciones de reacción estándar especificadas (Sambrook *et al.*, 1989).

### **2.4.3.4. *Taq* polimerasa**

Si las concentraciones de *Taq* polimerasa son mayores que las requeridas pueden sintetizarse productos no específicos (Sambrook *et al.*, 1989; Brown, 2000).

### **2.4.3.5. dNTP**

La concentración de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) en la mezcla de reacción es generalmente de 200 μM. Se debe comprobar que estas concentraciones sean iguales, porque una inexactitud aumentará el grado de incorporación errónea (Sambrook *et al.*, 1989).

## **2.4.4. Variantes de la PCR**

En los últimos años existen muchas variantes de la PCR como Múltiple PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR, Real time PCR, RT-PCR y otras más (Pérez, 2006).

## **2.4.5. PCR Múltiple**

La PCR múltiple puede ser utilizada para el análisis simultáneo de diferentes cepas o aislados patogénicos y no patogénicos, para ello se utiliza una combinación de pares de cebadores específicos para secuencias diana. Esta técnica posee la habilidad de identificar un patógeno o un grupo de patógenos en una población mixta conteniendo organismos relacionados o no.



Actualmente, existen ensayos de PCR en los cuales se utilizan secuencias específicas de genes que permiten identificar género, especie o serovar de *Salmonella*. Uno de esos genes es el *invA* perteneciente al género, el cual contiene secuencias únicas de este género y ha sido probado como un blanco apropiado de PCR, con una potencial aplicación diagnóstica (Rahn *et al.*, 1992). Este gen codifica la proteína en la membrana interna de las bacterias que es responsable de la invasión de las células epiteliales del huésped (Darwin y Miller, 1999).

Así mismo, la identificación de *Salmonella* hasta serovar aún es muy limitada, debido a que existe una gran cantidad de serovares (Grimont y Weill, 2007). Sin embargo, dentro los cebadores que hasta el momento han sido diseñados, los que permiten identificar a los serovares Typhimurium y Enteritidis son los más utilizados debido a que éstos representan un problema para humanos y animales a nivel mundial (CFSPH, 2005).

El gen *fliC* de la flagelina codifica el mayor componente del flagelo de *Salmonella* Typhimurium, utilizándose la identificación de este serovar (Aldridge *et al.*, 2006), el cual ha sido utilizado en otros estudios de investigación en muestras de órganos de cuyos sospechosos de presentar salmonelosis con gran eficiencia (Marcelo *et al.*, 2015). Por otro lado, el serovar Enteritidis alberga en su genoma un plásmido único de virulencia de 60kb (Chu *et al.*, 1999) este plásmido posee un gen llamado *Prot6E*, el cual probablemente codifique una única secuencia de superficie fimbrial específica de *Salmonella* Enteritidis (Clavijo *et al.*, 2006).

De esta manera, la utilización de la técnica de PCR múltiple es una herramienta muy útil que permite la identificación del ADN de *Salmonella* y sus serovares, brindando una mayor información si se precisa la identificación por serovar (Soumet *et al.*, 1999).

Los genes mencionados anteriormente, han sido empleados en otros estudios de investigación enfocados en distintas especies como aves, bovinos, ovejas, etc.(anexo 4), como los mencionados a continuación:

En el trabajo desarrollado por Soumet *et al.*, (1999) se buscó identificar *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis a partir de muestras ambientales de gallineros en Francia, donde

evaluaron en simultáneo las técnicas tradicionales de aislamiento microbiológico y pruebas bioquímicas comparándolas con la técnica de PCR múltiple, siendo esta última una técnica que requirió de tan solo 2 días comparada con los 5 a 6 días necesarios en las técnicas tradicionales. En este trabajo además llegaron hasta la identificación de los serovares *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*.

Jamshidi *et al.*, (2010) formularon un estudio con el objetivo de aislar e identificar *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium a partir de huevos en tiendas en Mashhad, utilizando el método de aislamiento microbiológico tradicional y el ensayo de PCR múltiple, donde fue posible detectar al serovar Typhimurium como el contaminante de mayor prevalencia en huevos.

Así mismo, años después en el mismo país, Atyabi *et al.*, (2012) realizaron una investigación molecular de los serovares Typhimurium y Enteritidis en el ganado vacuno y ovino en granjas, resultando que *S. Enteritidis* fue el serovar mayormente detectado y solo se encontró una infección mixta en dos animales.

Un estudio desarrollado por Moosavy *et al.*, (2015) tuvo como objetivo detectar *Salmonella* spp. en huevos comerciales en Irán, encontrando los serovares Typhimurium y Enteritidis en la cáscara y en el contenido del huevo. Como consecuencia de ese estudio se halló que el 1.33% del total de los huevos evaluados estaban contaminados con estos serovares.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.Lugar de estudio**

Las cepas en estudio fueron obtenidas en un trabajo de investigación previo, a partir de explotaciones comerciales de cuyes en el departamento de Lima. El procesamiento, análisis y conservación de las muestras se realizaron en la Sección de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2.Descripción del material experimental:**

##### **3.2.1. Cepas estudiadas**

En el presente estudio se evaluó un total de 25 cepas previamente caracterizadas morfológica y metabólicamente como *Salmonella* spp (anexo 1 y 2) provenientes de animales con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas sugerentes de salmonelosis. Las cepas se aislaron de hígado, vesícula biliar y médula ósea de 25 cuyes, las cuales fueron seleccionadas al azar pero solo una cepa de un órgano de cada animal. Las muestras se encontraban conservadas en caldo cerebro- corazón (BHI, por sus siglas en inglés) con glicerol al 20% en tubos de 2 mL a una temperatura de -80 °C.

### **3.2.2. Cepas de referencia**

Así mismo, en este trabajo se emplearon las cepas de referencia ATCC *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) y *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) como controles positivos aisladas según el protocolo descrito en el anexo 4 y conservadas en BHI con glicerol al 20 % y a una temperatura de -80°C. Además, se utilizaron dos cepas control negativas de *Escherichia coli* y *Proteus* spp previamente aisladas en la Sección de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, almacenadas en las mismas condiciones que las cepas de referencia control positivo.

### **3.3. Metodología**

#### **3.3.1. Reactivación de cepas**

Se reactivaron las 25 cepas de cuyes y las cepas de referencia (control positivo y negativo), empleando el protocolo descrito por Sánchez y Corrales (2005), con algunas modificaciones. El procedimiento para la reactivación de los microorganismos es descrito a continuación:

- a) Todas las cepas conservadas en glicerol (cepas estudiadas y las cepas control) fueron reactivadas llevándolas a una temperatura de -20°C y luego de 4°C, esperándose hasta la descongelación completa del vial antes de realizar la recuperación de los microorganismos.
- b) Posteriormente, con la ayuda de un asa de siembra se sembraron todas las cepas por agotamiento en placas de agar sangre y se incubaron a 37°C por 18 horas.
- c) En paralelo se sembraron las cepas estudiadas (25) en placas de agar XLD (agar xilosa, lisina, desoxicolato) para observar el crecimiento típico de las colonias y cortejar los datos brindados de éstas (producción de sulfuro de hidrógeno).
- d) Seguidamente, tanto las cepas en estudio como las cepas control fueron en 1ml de BHI (medio líquido usado para cultivar microorganismos patógenos y no patógenos incluyendo bacterias aerobias y anaerobias), incubándose a 37° por 24h.



**Figura 3. Colonias de *Salmonella* spp. en agar sangre**



**Figura 4. Colonias negras características de *Salmonella* spp. en agar XLD**

### 3.3.2. Extracción de ADN

Los cultivos obtenidos a partir del BHI de las 25 cepas y de las cepas de referencia control positivo, ATCC de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) y Enteritidis (ATCC 13076), y negativo, *Escherichia coli* y *Proteus* spp., se centrifugaron a 8000rpm durante 10 minutos para precipitar la biomasa celular, la cual fue transferida a un tubo microcentrífuga de 2ml, para proceder con la extracción de ADN de las 25 cepas. Se utilizó el Kit Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se colocó en tubos microcentrífuga de 1.5ml de capacidad y se almacenó a -20°C.

### 3.3.3. PCR múltiple

Para la identificación de las 25 cepas de *Salmonella* spp. se realizó una PCR múltiple usando tres pares de cebadores para el género *Salmonella*, y los serovares *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis los cuales amplifican secuencias específicas de los genes *invA*, *fliC* y *Prot6E*, respectivamente (Jamshidi *et al.*, 2010) (cuadro 3).

Además, se emplearon dos cepas control positivo de *S. Typhimurium* (ATCC 14028) y *S. Enteritidis* (ATCC 13076) y las cepas control negativo ya mencionadas.

La PCR múltiple fue realizada en un volumen final de 20µl consistiendo en 2.5µl de 10X PCR buffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl), 1 µl de desoxinucleotido trifosfato (0,5 mM), 0,5 µl MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), 0,4 µl por cada cebador, 0.3 µl de *Taq* DNA polimerasa y 2µl de ADN.

Las condiciones para la amplificación de los genes fue de la siguiente manera: una incubación inicial a 95°C por 5min, seguida por 35 ciclos con una desnaturalización a 95°C por 45 segundos, hibridación a 58°C por 45 segundos, una extensión a 72°C por 45 segundos, y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

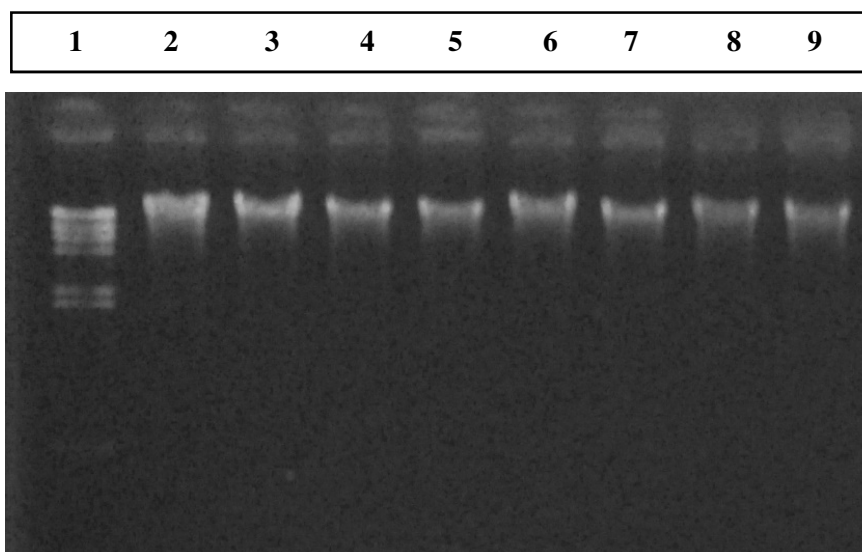
**Cuadro 3. Cebadores empleados en la PCR Múltiple**

Gen	Cebador	Secuencia	Longitud del producto amplificado	Referencia
		5' → 3'		
<i>invA</i>	S139 F	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	284 pb	Rahn <i>et al.</i> , 1992)
	S141 R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
<i>fliC</i>	Fli15 F	CGGTGTTGCCCAGGTTGGTAAT	559 pb	Soumet <i>et al.</i> , 1999
	Tym R	ACTCTTGCTGGCGGTGCGACTT		
<i>Prot6E</i>	Prot6e-5 F	ATATCGTCGTTGCTGCTTCC	185 pb	Clavijo <i>et al.</i> , 2006
	Prot6e-6 R	CATTGTTCCACCGTCACTTTG		

Los productos de la PCR múltiple fueron separados mediante electroforesis en gel al 2% con buffer TBE 0.5X a 100V durante dos horas en una cámara de electroforesis horizontal. Posteriormente, para evidenciar las bandas de ADN amplificadas, el gel fue teñido en bromuro de etidio y visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las distintas bandas se determinó mediante marcadores de peso molecular de 100pb (DNA *ladder*, Gene Ruler<sup>TR</sup>, Fermentas).

#### IV. RESULTADOS

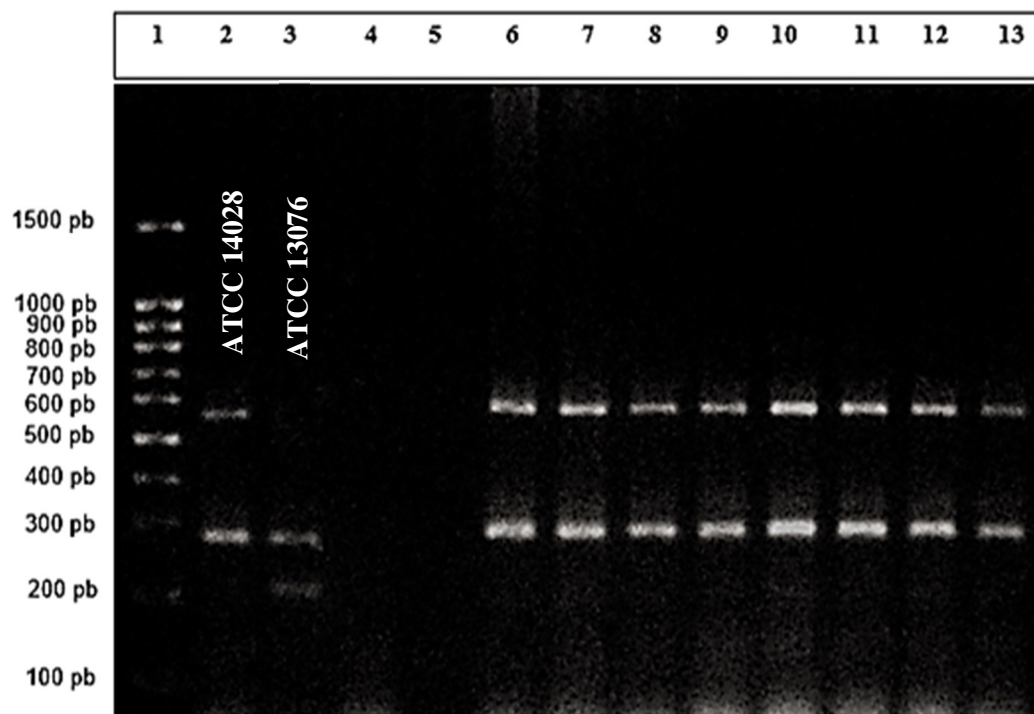
El ADN extraído de las 25 cepas de *Salmonella* spp. mostraron tener una buena concentración de ADN ( $100 \approx \text{ng}/\mu\text{l}$ ) y ser de buena calidad (no degradado y sin impurezas), siendo adecuados para proceder a la PCR múltiple



**Figura 5. Calidad de ADN de las cepas en estudio.** Nótese que en el carril número 1 se observa la banda de peso molecular  $\lambda$  DNA Hind III, que indica una concentración aproximada de 100 ng de ADN/ $\mu\text{l}$ , los carriles 2 al 9 muestran el ADN de aislamientos de *Salmonella* con concentraciones aproximadas de 100 ng de ADN/ $\mu\text{l}$



El ADN de las cepas de cuyes en estudio fue analizado mediante la técnica de PCR múltiple, junto con el ADN extraído de las cepas de referencia. En la figura 6, se observan los amplicones de 284pb y 559pb resultantes de las cepas en estudio (carril 6 al 13) los que coinciden con los obtenidos de la cepa de referencia control positivo ATCC 14028 (carril 2), mientras que la cepa ATCC 13076 solo tiene una banda de 284pb que coincide con las cepas en estudio que es la del gen *invA* que pertenece al género *Salmonella* (carril 3).



**Figura 6.** La PCR múltiple muestra bandas de 284pb, 185pb y 559pb en el gel agarosa amplificadas para los genes *invA*, *Prot6E*, y *fliC*. En el carril 1 se observa un marcador de peso molecular de 100pb, las cepas de referencia ATCC control positivo aparecen con dos bandas en el que *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (carril 2) presenta bandas de 284pb y 559pb y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (carril 3) con bandas de 284pb y 185pb, mientras que los controles negativos de *Escherichia coli* (carril 4) *Proteus* spp. (carril 5) evidencian bandas y las cepas estudiadas (carril 6-13) presentan bandas de 284pb y 559pb.

## V. DISCUSIÓN

La salmonelosis es una zoonosis ocasionada por microorganismos del género *Salmonella*, diversos estudios realizados en cuyes reportan a *S. Typhimurium* como el serovar detectado con mayor frecuencia, y ocasionalmente otros serovares como *S. Enteritidis* (Ameghino, 1968; Ramírez, 1972; Bustamante, 1993; Garmendia et al., 2000), identificados tradicionalmente mediante pruebas bioquímicas y serológicas que demandan de mayor tiempo y dificultan la toma de decisiones para el control de la enfermedad. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo identificar los serovares *Salmonella Typhimurium* y *Enteritidis* a partir de cepas de *Salmonella* spp aisladas de cuyes con salmonelosis mediante la técnica de PCR múltiple

En la técnica de PCR múltiple empleada, Jamshidi *et al.*, (2010), se utilizó tres pares de cebadores para la detección de secuencias específicas de los genes *invA* (Rahn *et al.*, 1992), *fliC* (Aldridge *et al.*, 2006; Soumet *et al.*, 1999) y *Prot6E* (Clavijo *et al.*, 2006) pertenecientes a *Salmonella* spp, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente, evidenciándose amplicones que indicaban los distintos pares de bases obtenidos para el género y los serovares. La cepa control positivo de *S. Typhimurium* (ATCC 14028) presentó amplicones de 284pb (gen *invA*) y 559pb (gen *fliC*), mientras que el control positivo de *S. Enteritidis* (ATCC 13076) presentó amplicones de 284pb (gen *invA*) y 185pb (gen *fliC*), y las 25 cepas de cuyes mostraron amplicones coincidentes con los obtenidos por el control positivo de *S. Typhimurium*.

Se confirmó los resultados de las pruebas bioquímicas (anexo 2) de las 25 cepas identificadas previamente como *Salmonella* spp. debido que se obtuvo amplicones de 284pb pertenecientes a dicho género en las 25 muestras. Además, gracias a la obtención de amplicones de 559pb se identificó como *S. Typhimurium* al 100% de las muestras evaluadas, que generalmente requeriría de una identificación serológica completa para la determinación de serotipo. Los resultados obtenidos son similares a los mencionados en otros reportes, que indican que *S. Typhimurium* se encuentra en frecuencias que superan el 95% en relación a otros serovares hallados en cuyes (Ameghino, 1968; Ramírez, 1972; Bustamante, 1993; Garmendia *et al.*, 2000), de manera contraria a lo referido por Richardson (2000), Garmendia *et al.*, (2000) y Parra *et al.*, (2002), que mencionan que *S. Enteritidis* se encuentra también implicado en cuadros de salmonelosis en cuyes.

*Salmonella* spp. requiere de un diagnóstico microbiológico pormenorizado debido a las etapas sucesivas necesarias para su aislamiento (enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, siembra en placa con medios sólidos selectivos y diferenciales), el estudio de las características metabólicas de las colonias sospechosas (medios adecuados para su identificación) y finalmente el análisis antigénico (García, 2011). El uso de antisueros polivalentes proveen una identificación serológica mínima para una determinación presuntiva de *Salmonella* spp., ésta siempre debe ser apoyada por las características morfológicas y metabólicas de las colonias sospechosas, empero la identificación completa del microorganismo se consigue remitiendo las muestras a instituciones como el laboratorio de enteropatógenos del centro referencial del Instituto Nacional de Salud (INS), ente que permite su desarrollo (Baudart *et al.*, 2000).

Las pruebas moleculares se consideran herramientas de diagnóstico directo y que posee gran especificidad y rapidez en los resultados (Velilla, 2006). Hasta el momento se han desarrollado múltiples estudios de investigación que emplean la técnica de PCR múltiple para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Salmonella*, aplicadas a la

identificación de éstos en muestras provenientes de distintas especies, principalmente aquellas destinadas al consumo humano (Soumet *et al.*, 1999; Moosavy *et al.*, 2014; Atyabi *et al.*, 2011; Jamshidi *et al.*, 2010). Tales trabajos emplearon cebadores diseñados para la identificación de secuencias específicas presentes en los genes *invA*, *fliC* *protE6* (anexo 3), dichos genes han sido también utilizados en el presente estudio tras haber sido comprobada su eficacia en la identificación de estos microorganismos. Es así que de acuerdo a lo referido, en este trabajo se obtuvo que las cepas ATCC empleadas como controles positivos de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, evidenciaron amplicones de 284pb y 559pb, y 284pb y 185pb, respectivamente, y por el contrario en los controles negativos de *Escherichia coli* y *Proteus* spp. empleados no se evidenció ninguna banda inespecífica (figura 6), demostrándose que los genes mencionados son útiles para la identificación de microorganismos del género *Salmonella*, y los serovares *S. Typhimurium* y *Enteritidis*, al identificarse *S. Typhimurium* en las 25 muestras evaluadas(100%), se manifiesta la eficiencia de los cebadores aplicados en muestras provenientes de órganos de cuyes con signos clínicos sugerentes de salmonelosis.

El aislamiento de este microorganismo en distintos órganos (vesícula biliar, hígado y médula ósea) sugiere un carácter septicémico, como lo expuesto por otros autores quienes señalan que cuyes con salmonelosis, presentaron diversos órganos afectados en tales cuadros infecciosos (Ameghino, 1968; Ramírez, 1972; Morales *et al.*, 1995). Similar a lo que se refiere en otros roedores, como Elvidge (2013) quien describe que en infecciones experimentales de *Salmonella Typhimurium* a ratones se produce una infección generalizada contrariamente a lo que sucede en cerdos y ganado vacuno donde este serovar no involucra una diseminación sistémica, demostrándose que las infecciones producidas por los serovares de *Salmonella* en las distintas especies varía desde una infección septicémica a una que puede limitarse al tracto gastrointestinal. Además, se debe mencionar que el presente estudio encontró *S. Typhimurium* en médula ósea que no había sido reportado previamente por otro estudio en nuestro país, evaluándose un total de 5 muestras provenientes de este órgano, siendo todas las cepas estudiadas pertenecientes al serovar mencionado.

Finalmente, debido a que en nuestro país la alta mortalidad ocasionada por este agente causa grandes pérdidas económicas, y la identificación de éste suele requerir mucho tiempo, con este estudio buscamos ayudar a los productores para obtener un diagnóstico rápido y eficaz que les permita el control y tratamiento de esta enfermedad. De la misma manera, pueden haber intentos de diagnóstico de este microorganismo a partir de distintas muestras clínicas obtenidas de cuyes (heces, sangre, etc.) ya sean por casos de salmonelosis o como un monitoreo en granja. Además, la identificación del género *Salmonella*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, permitiría saber cómo se encuentra la presencia de estos dos serovares en nuestro medio, ya que aún hay escasos estudios que permitan determinar la prevalencia de éstos en cuyes.

## VI. CONCLUSIONES

- Se logró identificar *Salmonella* Typhimurium en el 100% de las cepas aisladas de cuyes mediante la técnica de PCR múltiple debido a la amplificación de los genes *invA* (género *Salmonella*) y *fliC* (serovar *Salmonella* Typhimurium) de 284pb y 559pb, respectivamente.
- Se implementó un protocolo para la identificación específica de *Salmonella* spp. y los serovares *S.* Typhimurium y Enteritidis.

## VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Aldridge P, Gerer J, Karlinsey JE, Hughes KT. 2006.** Transcriptional and translational control of the *Salmonella* *fliC* gene. J Bacteriol. 188, 4487–4496.
2. **Ameghino EF. 1968.** Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (*Cavia cobaya*): 3er boletín extraordinario. Lima: IVITA. 260 p.
3. **Atyabi N, Zahraei T, Ghazisaeedi F, Ashrafi I. 2012.** The molecular investigation of widespread *Salmonella* serovars, *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis, involved in salmonellosis of cattle and sheep in farms around Tehran, Iran. Iranian J Vet Research, Shiraz University, Vol. 13, No. 2. 39: 126-133.
4. **Barrow PA. 1999.** Virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. En: Saeed A.M. Ed. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals, Iowa State University Press, Ames, USA, p 173-181.
5. **Baudart J, Lemarchand K, Brisabois A, Lebaron P. 2000.** Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. Appl Environ Microbiol. 66:1544-52.
6. **Brooks G, Morse S, Butel J. 1999.** Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. México: El Manual Moderno. 677 p.

7. **Brown T. 2000.** The polymerase chain reaction. En: Essential molecular biology. A practical approach. Vol. 2. 2da ed. Oxford University. p 89-120.
8. **Bunte K. 1996.** Analyses of the temporal variation of coarse bedload transport and its grain size distribution (Squaw Creek, Montana, USA). U.S.D.A., Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, General Technical Report RM-GTR-288, 124 p.
9. **Bustamante J. 1993.** Producción de cuyes. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 259 p.
10. **Caffer MI, Terragno R, Binsztein N. 2008.** Manual de Procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. 1ra ed. Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. WHO global Salm Surv para América del Sur; p 5-9.
11. **Caffer M, Terragno R. 2001.** Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella. Buenos Aires: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas. 37p
12. **Cano J. 2012.** Efecto de la suplementación de probiótico líquido sobre los parámetros productivos en cuyes (*Cavia porcellus*) durante la fase de crecimiento y engorde. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
13. **[CFSPH] Center for Food Security and Public Health. 2005.** Animal disease factsheets. Salmonellosis. Iowa State University, Ames, IA, USA. p 1-8.
14. **Chauca L. 1997.** Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación - FAO. 78 p
15. **Chauca L. 1994.** Crianza de cuyes, rol socio-económico y avances de investigación (Continuación). Agroenfoque. 9(67):36-37.
16. **Clavijo R, Loui C, Andersen G, Riley L, Lu S. 2006.** Identification of genes asociated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. Appl. Environ Microbiol. 72(2), 1055-1064.



17. **Chu C, Hong S, Tsai C, Lin W, Liu T, Ou J. 1999.** Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, and Dublin. *Infection and Immunity*. 67, 2611–2614.
18. **Collazos JA. 2008.** Aportaciones al diagnóstico y control de la salmonelosis porcina. Tesis Doctoral. Universidad de León. 306p
19. **Cote S, Letellier A, Lessard L, Quessy S. 2004.** Distribution of *Salmonella* in tissues following natural and experimental infection in pigs. *Can. J. Vet. Res.* 68:241-248.
20. **Darwin K, Miller V. 1999.** Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Mol Microbiol Rev*; 12: 405-28.
21. **Dibb-Fuller MO, Allen-Vercoe E, Thorns CJ, Woodward MJ. 1999.** Fimbriae-and flagella-mediated association with an invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology*, 145, 1023-1031
22. **Eckmann L, Rudolf MT, Ptasznik A, Schultz C, Jiang T, Wolfson N, Tsien R, Fierer J, Shears SB, Kagnoff MF, Traynor-Kaplan AE. 1997.** D-myoinositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate produced in human intestinal epithelial cells in response to *Salmonella* invasion inhibits phosphoinotide 3-kinase signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94: 14456-14460.
23. **Ekperigin HE, Nagaraja KV. 1998.** Microbial food borne pathogens. *Salmonella*. *Vet. Cl. N. Am. Food Anim. Pract.* 14: 17-29.
24. **Elvidge A. 2013.** Identification and characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium factors playing a role in the colonization of the porcine gut. *Universitu of Edinburg*. 203p
25. **Enríquez MR, Rojas FM. 2004.** Normas generales para la crianza de cuyes. Dirección regional de agricultura. Junín. Dirección de promoción agraria, coordinación de crianzas. Perú. Vol. 1. p 32

26. **Evans AR. 2005.** Import risk analysis: Domestic guinea pig, *Cavia porcellus*, imported from Australia [Internet], [Octubre 2015]. Disponible en: [http://hintlink.com/guinea\\_pig/Nzriskanalysis.pdf](http://hintlink.com/guinea_pig/Nzriskanalysis.pdf).
27. **Fedorka-Cray PJ, Whipp SC, Isaacson RE, Nord N, Lager K. 1994.** Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. *Vet. Microbiol.* 41: 333-344.
28. **Figueroa I, Verdugo A. 2005.** Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev. Lat. Microbiol. ALAM* 47: 25-42.
29. **Ganaway JR. 1976.** The biology of the guinea pig. Academic Press, New York.
30. **Garber L, Smeltzer M, Fedorka-Cray P, Ladely S, Ferris K. 2003.** *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis in table egg layers house environments and in mice in U.S. layer houses and associated risk factors. *Avian Dis.* 47: 134-142.
31. **Garmendia M, Selgrad S, Alezones F. 2000.** Salmonelosis en animales de laboratorio. FONAIAP [Internet], [Octubre 2015]. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistastec/FonaiapDivulga/fd68/texto/mgarmendia.htm>
32. **García F. 2011.** Salmonelosis porcina en España: Prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana. Tesis Doctoral. España: Univ. de León. 197 p.
33. **Garrity G, Bell J, Liburn T. 2004.** Taxonomic outline of Prokariotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition. Release 5.0. Springer-Verlag, New-York. P 79-122.
34. **González T, Rojas RA. 2005.** Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México.* 47 (5): 388-390.
35. **Goyache J, Briones V. 2002.** Géneros *Salmonella* y *Shigella*. En: Vadillo S, Piriz M. Manual de microbiología veterinaria. Cap 22. Madrid: McGraw-Hill. p 327-338.
36. **Grimont P, Weill F. 2007.** Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, 9th Ed., World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France. 166p

37. **Guamán P. 2014.** Determinación del género y especie de *Salmonella* en cuyes mestizos en diferentes sistemas de crianza en la comunidad de Oñacpac del Cantóon Saraguro. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Cuenca- Ecuador: Univ. Politécnica Salesiana sede Cuenca. 105p
38. **Havelaar A, Garssen T, Takumi K, Koedam M, Dufrenne J. 2001.** A rat model for dose-response relationships of *Salmonella* Enteritidis infection. *J Appl Microbiol* 91: 442-452.
39. **Hensel M. 2000.** *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 36:1015-1023.
40. **Herráez A. 2012.** Biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. 2da ed. Elsevier: España. 512p
41. **[INEI] Instituto Nacional de estadística e informática. 2012.** IV Censo nacional agropecuario 2012-sistema de consulta de cuadros estadísticos. Perú: INEI [Internet], [Agosto 2014]. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/>
42. **Innis A. 1995.** PCR strategies. 2da ed. Academic Press, UK
43. **Jamshidi A, Kalidari G, Hedayati M. 2010.** Isolation and identification of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from the eggs of retail stores in mashhad, iran using conventional culture method and multiplex PCR assay. *Journal of Food Safety* 30. 558–568.
44. **Koneman E, Allen V, Dowel V, Sommers H. 1998.** Diagnóstico Microbiológico. Ed.3ra. Buenos Aires: Médica Panamericana. 909p
45. **Layme A. 2010.** Frecuencia de lesiones anatomopatológicas en Cobayos con diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* sp. remitidos al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la FMV-UNMSM durante el período 2001-2007. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
46. **Loynachan AT, Nugent JM, Erdman MM, Harris DL. 2004.** Acute infection of swine by various *Salmonella* serovars. *J. Food Prot.* 67: 1484-1484.

47. **MacFaddin JF. 2000.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires- Argentina. 301p
48. **Marcelo G, Chero A, Díaz G, Rimac R, Hurtado R, Ciprian A, Rosadio R, Maturrano L. 2015.** Evaluación de un protocolo de PCR múltiple para la identificación de *Salmonella* Typhimurium en cobayos. En: XXXVIII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Ayacucho-Perú: APPA.
49. **Marcus S, Brumell J, Pfeifer C, Finlay B. 2000.** *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, Vol. 2, No. 2. ISSN 1286-4579. p 145-156.
50. **Matsuura SA. 2008.** Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de *Salmonella enterica* aislada de cobayos de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 65p
51. **Matsuura A, Morales S, Calle S, Ara M. 2010.** Susceptibilidad a Antibacterianos in vitro de *Salmonella enterica* aislada de Cuyes de Crianza Familiar-Comercial en la Provincia de Carhuaz- Áncash. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú*. 21(1): 93-99.
52. **Meerburg B, Kijlstra A. 2007.** Role of rodents in transmission of *Salmonella* and *Campylobacter*. *J Sci Food Agric*. 87: 2774-2781.
53. **Moosavy M, Esmaili S, Amiri F, Mostafavi E, Salehi Z. 2015.** Detection of *Salmonella* spp in commercial eggs in Iran. University of Tabriz, Tabriz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. Vol 7 Number 1. p 50-54
54. **Morales S, Mattos J, Calle S. 2007.** Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) en la dinámica de la infección por *Salmonella enterica* en cobayos. En: XXX Reunión Científica Anual Asociación Peruana de Producción Animal. Cuzco-Perú: APPA.
55. **Morales S, 2012.** Patógenos oportunistas por transmisión fecal- oral en cuyes reproductores introducidos al distrito de San Marcos. Laboratorio de investigación. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Univ. Científica del Sur. *Científica* 9 (1) 33-

38. [Internet] [Julio 2015] Disponible en:  
<https://issuu.com/bibliotecacientifica/docs/cientifica-v9n1/33>
56. **Morales CM, Hung A, Alvarado A. 1995.** Mortalidad por salmonelosis en cobayos. En: Investigaciones en cuyes. APPA 1994-2007. [Internet], [Agosto 2015] Disponible en:  
<http://www.inia.gob.pe/documentos/APPA-RESUMEN-1994-2007.pdf>.
57. **Mullis K B, Fabona FA. 1987.** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
58. **Myint MS, Johnson YJ, Tablante NL, Heckert RA. 2006.** The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiol* 23, 599-604.
59. **Nielsen B, Baggesen D, Bager F, Haugegaard J, Lind P, 1995.** The serological response to *Salmonella* Typhimurium and *S. Infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Vet. Microbiol.* 47, 205– 218.
60. **Ordaya E. 2008.** Potenciales vectores y fómites para la transmisión de *Salmonella enterica* en la crianza comercial de cuyes en el Valle del Mantaro. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Hermilio Valdizan. 63 p
61. **Pachón DA. 2009.** Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y Testudines mantenidos en cautiverio en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco EBTRF de la Facultad de Ciencias. Tesis de Biología. Bogotá: Univ. Nac. de Colombia en Villavicencio. Pontificia Universidad Javeriana. 115p.
62. **Parker M, Collier L. 1990.** Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Ed. 8th. London: Edward Arnold. 100p.
63. **Parra M, Durango J, Mattar S. 2002.** Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por salmonella. *MVZ-Córdoba* 7: 187-200.

64. **Pérez D. 2006.** Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 91 p.
65. **Peters L.J. 1981.** The guinea pig: An overview Part II. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 3: 403.
66. **Popoff M, Le Minor L. 1997.** Antigenic formulas of the *Salmonella* Serovars. 7th revision. WHO collaborating center for reference and research on Salmonella. Institut Pasteur. Paris-France. 151p
67. **Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002.** Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, caprino y equino. 9° ed. Madrid: Mc Graw-Hill. 959p
68. **Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, Curtiss R, Gyles CL. 1992.** Amplification of an invA gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol. Cell. Probes. p 6: 271- 279.
69. **Ralph A. 1996.** Salmonella. In: Medical Microbiology, 4th Edition. Edited by Samuel Baron. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas. Chapter 21.
70. **Ramírez I. 1972.** Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 62p.
71. **Ramírez VLA. 1974.** Salmonelosis en cobayos (*Cavia porcellus*), aspectos epidemiológicos. 11 CONIAP, Lima, Perú.
72. **Ramírez VA. 1976.** Salmonelosis en cobayos. En: Primer curso de producción y sanidad en cuyes y conejos. Lima: Asociación de Médicos Veterinarios del Perú.
73. **Richardson VC. 2000.** Diseases of Domestic Guinea Pigs. 2th ed. Oxford: Blackwell science Ltd. 145p.
74. **Sambrook J, Fritish E. Maniatis T. 1989.** Molecular cloning: A laboratory manual. Vol. 2. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. p 14.6-14.20.

75. **Sánchez M, Cardona N. 2003.** Mecanismos de interacción de Salmonella con la mucosa intestinal. *Infectio.* 7(1):22-29. [Internet], [Julio 2015] Disponible en: [http://www.revistainfectio.org/site/Portals/0/volumen7\\_1/MECANISMOS%20DE%20INTERACCION%20DE%20SALMONELLA%20CON%20LA%20MUCOSA%20INTESTINAL.pdf](http://www.revistainfectio.org/site/Portals/0/volumen7_1/MECANISMOS%20DE%20INTERACCION%20DE%20SALMONELLA%20CON%20LA%20MUCOSA%20INTESTINAL.pdf).
76. **Sánchez L, Corrales R. 2005.** Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Colombia: Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 9p. [Internet], [Junio 2015]. Disponible en: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:GXyLVUFPFkJ:www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/ARTORIG2\\_4.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:GXyLVUFPFkJ:www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTORIG2_4.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe).
77. **Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, Collin P. 1999.** Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs poultry houses. *Lett App Microbiol.* p 29:1-6.
78. **Stanchi O. 2007.** Microbiología Veterinaria. 1ra ed. Buenos Aires- República Argentina: Intermédica. p 210-214.
79. **Stellmacher W. 1981.** Infecciones por *Salmonella*. En: Beer J, eds. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Ed. Zaragoza: Acribia. p 59-81.
80. **Stracham T, Read A. 1999.** Human molecular genetics 2. BIOS. Scientific publishers Ltd.
81. **Terragno R, Caffer M, Bruna S, Binsztein N. 2003.** Manual de procedimientos. Salmonella: Parte I. Aislamiento, identificación y serotipificación. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Global Salm- Surv y CDC, Buenos Aires, Argentina.
82. **Velasco M, Yamasaki. 2002.** Bacterias de interés veterinario. *Medicina Veterinaria.* 19 (1):1-11
83. **Velilla A, Terzolo H, Feingold S. 2006.** Avances en el diagnóstico molecular de Salmonella. Mundo lácteo y cárnico. [Internet], [Septiembre 2014]. Disponible en: [http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLC010\\_DIAMOLSAL.pdf](http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLC010_DIAMOLSAL.pdf)

84. **Vimal DB, Khullar M, Gupta S, Ganguly NK. 2000.** Intestinal mucins: the bindings sites for *Salmonella* Typhimurium. Mol. Cell. Biochem. 204p
85. **Walker, S. 1999.** Microbiología. México: Mc Graw Hill Interamericana.513p
86. **Wood RL, Pospischil A, Rose R. 1989.** Distribution of persistent *Salmonella* Typhimurium infection in internal organs of swine. Am. J. Vet. Res. 50: 1015-1021.
87. **Wood RL, Rose R. 1992.** Populations of *Salmonella* Typhimurium in internal organs of experimentally infected carrier swine. Am. J. Vet. Res. 53: 653-658.
88. **[WHO] World Health Organization. 2013.** Drug- resistant Salmonella. Fact sheet N°139. [Internet], [Julio 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>
89. **Zhang S, Adams LG, Nunes J, Khare S, Tsolis RM, Bäumler AJ. 2003.** Secreted effector proteins of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium elicit host-specific chemokine profiles in animal models of typhoid fever and enterocolitis. Infect. Immun. 71: 4795-4803.
90. **Zhou D, Galán J. 2001.** *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. Microb. Infect. 3:1293-1298. [Internet], [Julio 2015] Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457901014897>.



## **VIII. ANEXOS**

## **Anexo 1. Protocolo de aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp.**

Protocolo de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. según Caffer *et al.*, (2008) con algunas modificaciones.

El protocolo de aislamiento se basa en las siguientes etapas:

1. **Pre-enriquecimiento en medio no selectivo:** Se toma una porción no mayor a 1g de cada órgano, en el caso del líquido biliar se toma una cantidad no mayor a 1ml, y se añade en relación de 1:10 con el agua peptonada tamponada, por separado. Luego se incuba a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 h.
2. **Enriquecimiento en medio selectivo:** Se añade 1ml de la muestra del paso anterior en una relación de 1:10 en caldo Rappaport – Vassiliadis bufferado y se incubó a  $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18-24h.
3. **Aislamiento en medio selectivo y diferencial:** Del cultivo obtenido en el paso anterior se siembra por agotamiento medios sólidos selectivos:
  - Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), se incuba a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .
  - Agar MacConkey (MC), se incuba a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .
4. **Confirmación bioquímica:** Las colonias aisladas previamente en el agar XLD y/o MC, se someten a pruebas bioquímicas con el fin de evaluar sus características metabólicas, utilizando el agar LIA y TSI, se incuba a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$
5. **Pruebas bioquímicas complementarias:** Las colonias compatibles con las características metabólicas de *Salmonella* en los agar LIA y TSI, son sembradas en pruebas bioquímicas complementarias, como el agar urea, citrato de Simmons y SIM, se incuba a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .
6. **Conservación de cepas:** Luego de obtener los resultados de la confirmación bioquímica, se conservan 3 a 4 colonias en BHI con glicerol al 20% a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Anexo 2. Pruebas bioquímicas realizadas previamente a las 25 cepas en estudio y sus resultados**

Órgano	Número de cepas	TSI	LIA	SIM			Urea	Citrato
				H <sub>2</sub> S	Indol	Móvil		
Hígado	9	K/A H <sub>2</sub> S + gas	K/K	+	-	+	-	+
Vesícula biliar	11	K/A H <sub>2</sub> S + gas	K/K	+	-	+	-	+
Médula ósea	5	K/A H <sub>2</sub> S + gas	K/K	+	-	+	-	+

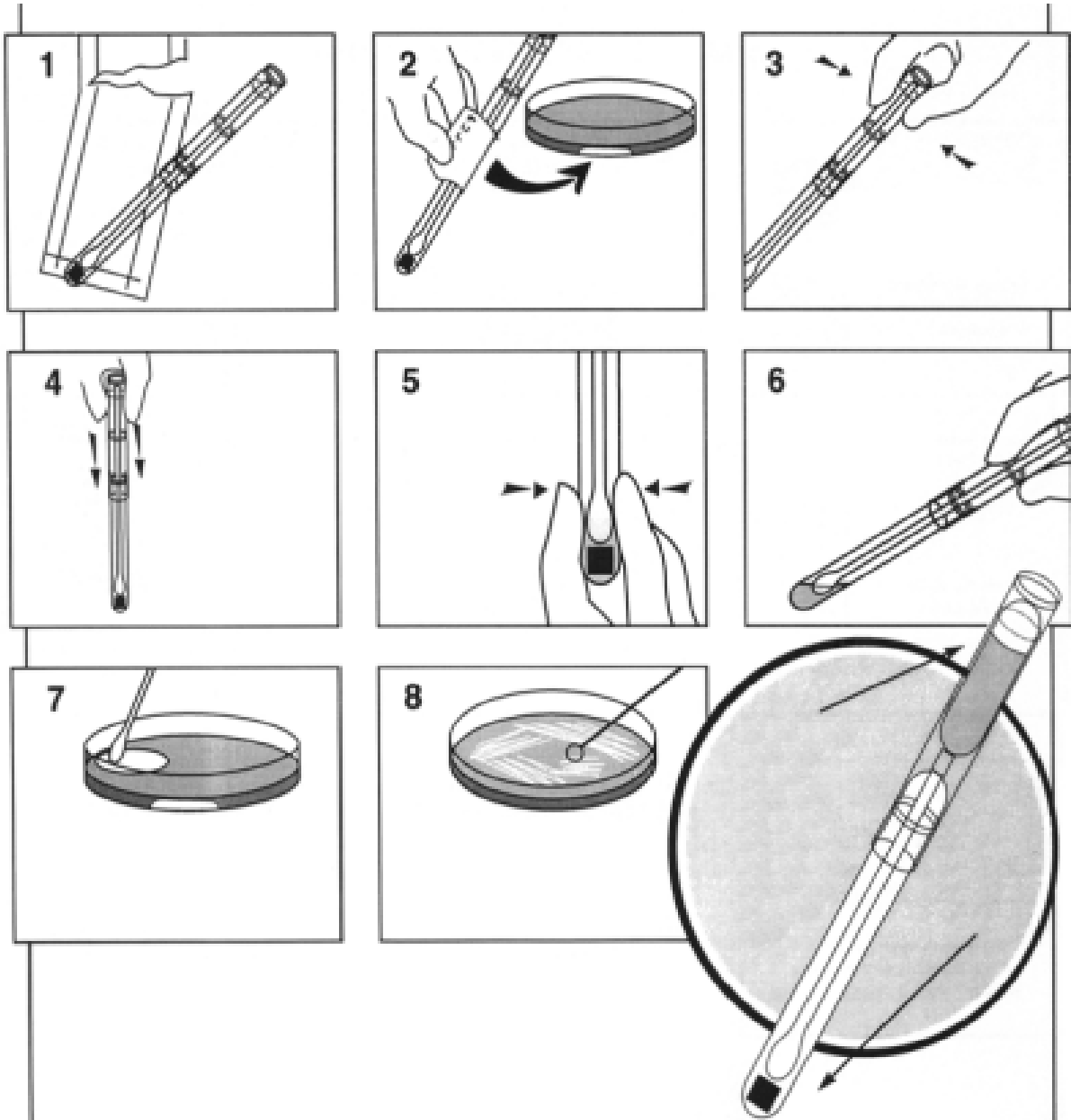
K: alcalino; A: ácido; H<sub>2</sub>S: Sulfuro de hidrogeno

### Anexo 3. Cebadores específicos para la identificación de genes de Salmonella.

Gen	Cebador	Secuencia	Fuente
<i>fliC</i>	Fli15	CGG TGT TGC CCA GGT TGGTAAT	Soumet <i>et al.</i> , (1999)
	Tym	ACT CTT GCT GGC GGT GCG ACTT	
<i>InvA</i>	ST141	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	Moosavy <i>et al.</i> , (2014)
	ST139	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
<i>invA</i>	ST141	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	Atyabi <i>et al.</i> , (2011)
	ST139	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
<i>invA</i>	ST141	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	Jamshidi <i>et al.</i> , (2010)
	ST139	TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	
<i>fliC</i>	Fli15	CGG TGT TGC CCA GGT TGGTAAT	
	Tym	ACT CTT GCT GGC GGT GCG ACTT	
<i>Prot6E</i>	Prot6e-5	ATA TGG TCG TTG CTGCTT CC	
	Prot6e-6	CATTGT CCA CCG TCA CTTTG	

Anexo 4. Ceba de microorganismo integrado en un dispositivo de rehidratación listo para su uso.

Cepas control ATCC de *Salmonella* (Microbiologics)



### **Procedimiento de siembra y aislamiento**

1. Abrir el embalaje
2. Quitar el embalaje y pegar sobre la placa Petri o ficha de seguimiento
3. Romper la ampolla para liberar el líquido de hidratación.
4. Facilitar la bajada de líquido hasta la pastilla
5. Aplastar la pastilla y mezclarla con el líquido
6. Saturar el escobillón
7. Sembrar las placas con el escobillón
8. Practicar un aislamiento desde la zona de depósito